

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 153 768**

⑫ Número de solicitud: 009900529

⑬ Int. Cl.⁷: G01N 27/447

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **15.03.1999**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2001**

Fecha de concesión: **10.08.2001**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.11.2001**

⑱ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.11.2001

⑲ Titular/es: **Bernardo Hernández Tudela**
Avda. Barón de Cárcer, 50
46001 Valencia, ES
Vicente M^a Villar Amigo y
Jose M^a Benlloch Baviera

⑳ Inventor/es: **Hernández Tudela, Bernardo;**
Villar Amigo, Vicente M^a y
Benlloch Baviera, José María

㉑ Agente: **Cañadell Isern, Roberto**

㉒ Título: **Secuenciador perfeccionado de proteínas y ácidos nucleicos, por electroforesis, y procedimiento para su operación.**

㉓ Resumen:

Secuenciador perfeccionado de proteínas y ácidos nucleicos, por electroforesis, y procedimiento para su operación.

El secuenciador perfeccionado de proteínas y ácidos nucleicos por electroforesis, y procedimiento para su operación, que constituye el objeto de esta Patente, realiza dicho proceso en el seno de un gas inerte.

Su estructura se compone de: una cámara oscura (1) con dos electrodos (2)-(2') en planos opuestos, alimentación de gas (3) e inyección de la muestra acuosa mediante un electro-spray (4); un sistema electrónico de adquisición de datos, con ordenador (6); y una fuente de alimentación de corriente continua (7) con doble conmutador (8) para cambio de polaridad de los electrodos.

En la utilización del secuenciador con radiactividad, las moléculas son marcadas con un radioisótopo, llegando al segundo electrodo compuesto por dos planchas (10)-(10'), la frontal de orificios (11), entre las cuales se encuentra un centelleador (12), que facilita la detección de las moléculas mediante un fotodetector (13) que informa al ordenador (6).

En la utilización sin radiactividad, el segundo electrodo es un detector eléctrico gaseoso (14).

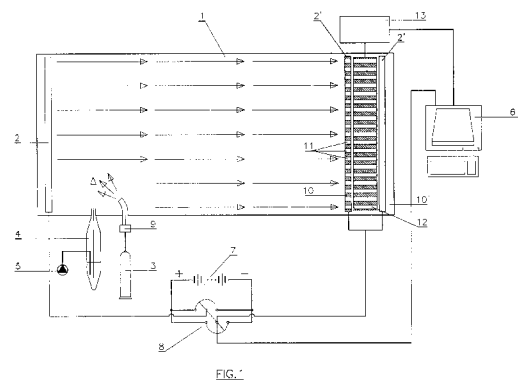


FIG. 1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

DESCRIPCION

Secuenciador perfeccionado de proteínas y ácidos nucleicos, por electroforesis, y procedimiento para su operación.

Objeto

El objeto al cual se refiere la invención que se protege en esta Patente, consiste en un Secuenciador perfeccionado de proteínas y ácidos nucleicos, por electroforesis, y procedimiento para su operación.

Se trata, por tanto, de un dispositivo aplicable a la determinación por electroforesis tanto de los aminoácidos que forman las proteínas como de las bases que componen los ácidos nucleicos, así como a su distribución secuencial en las macromoléculas de dicho material biológico.

Antecedentes

La electroforesis es un método analítico de separación de las partículas con carga eléctrica contenidas en una solución de una mezcla de ellas, mediante la acción de un campo eléctrico.

El método está basado en la diferencia entre las velocidades de migración de las diferentes partículas, según sus dimensiones y su carga, pudiendo realizarse dicha migración en el seno de un líquido (electroforesis en fase libre o de gradiente móvil) o bien sobre un líquido mantenido sobre un soporte idóneo (electroforesis de zona), por ejemplo, geles de agarosa, poliacrilamida, etc. Este último se aplica con finalidades clínicas, en el diagnóstico de numerosas enfermedades mediante el análisis de proteínas séricas, que son cuantificadas por lectura fotométrica directa (proteínograma).

En los secuenciadores conocidos se vienen utilizando rayos láser para la excitación de las moléculas con la consiguiente emisión de luz a fin de que puedan ser detectadas en su migración por dispositivos fotosensibles.

El procedimiento conocido adolece de una cierta lentitud ya que puede durar varias horas, incluyendo la costosa preparación de los geles, por lo que se pretende acortarlo mediante variantes como la electroforesis capilar o la utilización de geles ultrafinos; pero aun con estas técnicas, la duración de los análisis resulta considerable, del orden de los 15 a 20 minutos.

Descripción de la invención

La finalidad de la invención que constituye el objeto de esta Patente, consiste en la superación de los inconvenientes propios del procedimiento analítico porelectroforesis conocido, precedentemente descritos (y singularmente, su lentitud), habiendo sido concebida y diseñada atendiendo a este objetivo prioritario.

Para ello, se ha modificado la naturaleza del fluido en el seno del cual se produce la electroforesis, sustituyendo los geles de soporte conocidos por un gas inerte, preferentemente argón, lo cual da lugar a las siguientes ventajas:

- Reducción del tiempo necesario para completar el proceso de separación de las macromoléculas, que puede hacerse de forma prácticamente instantánea, con una duración del orden de un segundo.

- Reducción del costo del dispositivo, tanto por la supresión del gel como por la innecesarie-

dad de los rayos láser, por emplearse como detector eléctrico gaseoso el propio gas inerte utilizado como medio y soporte de la electroforesis.

Posibilidad de analizar no solamente cadenas simples de ADN (ácido desoxiribonucleico) sino también macromoléculas de ADN de doble hélice.

El secuenciador perfeccionado que constituye el objeto de esta Patente, comprende los siguientes elementos estructurales:

Una cámara oscura, con flujo controlado del gas inerte en cuyo seno tiene lugar la electroforesis, provista de electrodos de plancha metálica, preferentemente cobre, en extremos opuestos, alimentación de gas e inyección de la muestra acuosa de proteínas o ácidos nucleicos.

Dicha muestra se obtiene a partir del material biológico disponible (sangre, tejidos, etc.) extrayéndole las proteínas o ácidos nucleicos mediante técnicas convencionales, y multiplicando la cantidad final de ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

Un electro-spray, con equipo de bombeo inyector de la muestra nebulizada en aerosol, capaz de pulverizar las macromoléculas en dimensiones del orden de pocos nanómetros (un nanómetro es uno por diez elevado a menos nueve metros).

Un sistema electrónico de adquisición de datos, acoplado a un ordenador, previa calibración del aparato, capaz de calcular el tiempo invertido por las moléculas de ADN de la muestra inyectada, en recorrer la distancia que separa los electrodos de la cámara y deducir, en función de su valor, la masa de dichas moléculas, previa calibración del aparato.

Una fuente de alimentación de energía eléctrica en corriente continua, con posibilidad de conexión alternativa y simultánea a los electrodos (por ejemplo, mediante dos conmutadores de accionamiento conjunto), a fin de que el cambio de polaridad permita su utilización indistinta con moléculas con carga positiva o negativa, estando conectado al ordenador el medio de conmutación.

El funcionamiento del secuenciador perfeccionado es el siguiente:

Las partículas con carga eléctrica producidas por el electro-spray, son barridas hacia el electrodo más próximo por un flujo de gas inerte (en su caso, argón), quedando retenidas en dicho electrodo, por la acción del campo eléctrico del mismo.

Al finalizarla inyección de la muestra, se conectan simultáneamente ambos electrodos a la alimentación de corriente continua, en polos opuestos, iniciándose la migración electroforética de las macromoléculas, de cuya partida del electrodo en el que estaban retenidas queda informado el ordenador por la conexión del medio de conmutación, a efectos del cálculo programado del tiempo invertido hasta su llegada al electrodo opuesto.

La detección de su llegada puede realizarse por distintos procedimientos:

- *Por radiactividad:* Las moléculas son marcadas previamente con un radioisótopo, preferentemente fósforo 32, y llegan al segundo electrodo que está formado por dos planchas metálicas de las cuales la frontal presenta numerosos orificios de muy pequeño diámetro, distribuidos ordenada-

mente, entre cuyas planchas se coloca una placa transparente de centelleo, con orificios coincidentes con los de la plancha frontal.

Al llegar las macromoléculas al segundo electrodo, penetran por los orificios de la plancha frontal y al pasar por el centelleador, las partículas emitidas por su radiactividad producen luz de centelleo, que es captada por un fotodetector (fotomultiplicador o fotodiodo), que transforma la energía luminosa en un pulso eléctrico, el cual sirve para informar al ordenador de la finalización del recorrido de las macromoléculas.

- *Sin radiactividad*: La llegada de las macromoléculas al segundo electrodo es señalada por un detector eléctrico gaseoso que utiliza el propio gas inerte electroforético como medio de detección ya que, al aproximarse las moléculas al detector (p. ej. cámara de hilos o MWPC Multiwire Proportional Chamber), que actúa como segundo electrodo, encuentran un elevado campo eléctrico que hace que se aceleren y choquen con el gas, produciendo una avalancha de electrones detectable como señal eléctrica.

Esta forma de detección simplifica la que se basa en la radiactividad, ya que no requiere la marcación previa de las moléculas y permite prescindir de algunos elementos estructurales del segundo electrodo tales como la doble plancha metálica, el centelleador y el fotodetector.

Un tercer método de detección, que no hace uso de la radiactividad, está basado en que, al llegar las macromoléculas a las proximidades del segundo electrodo, producen una radiación lumínica, mediante diversos procesos físicos, detectable con la suficiente rapidez y precisión temporal.

En cuanto a la aplicación del secuenciador en su función específica, deben emplearse tantos dispositivos en paralelo como sean necesarios según el fraccionamiento requerido de las moléculas. Así por ejemplo, en el caso de los ácidos nucleicos serán necesarios cuatro dispositivos, correspondiendo cada uno a una de las bases nitrogenadas que lo componen; mientras que en el caso de las proteínas, se les aplican enzimas previamente a su paso por el secuenciador, para su corte por lugares específicos, utilizando después tantos secuenciadores en paralelo como tipos de aminoácidos intervengan en su composición.

Breve descripción de los dibujos

Para complementar la descripción de la invención y facilitar la interpretación de las características formales, estructurales y funcionales, de su objeto, se acompañan dibujos en los que se representan esquemáticamente diferentes aspectos de una realización preferente del secuenciador perfeccionado de proteínas y ácidos nucleicos, por electroforesis, que constituye el objeto de esta Patente.

En dichos esquemas, que se refieren ambos a secciones longitudinales orientativas de la cámara,

La Figura 1 muestra la disposición del secuenciador en cuya operación se utiliza la radiactividad para la marcación y seguimiento de las macromoléculas, representándose seccionado longitudinalmente el segundo electrodo, constituido por dos planchas metálicas, con el centelleador

interpuesto entre ambas.

La Figura 2 corresponde al secuenciador con detector eléctrico gaseoso, en el que éste está representado por una cámara de hilos (MWPC) que constituye el segundo electrodo, seccionado longitudinalmente.

Descripción de una realización preferente

Para mostrar con claridad la naturaleza y el alcance de la aplicación ventajosa del secuenciador perfeccionado de proteínas y ácidos nucleicos, por electroforesis, y procedimiento para su operación, que constituye el objeto de la invención, se describen seguidamente su estructura y su funcionamiento (o utilización), haciendo referencia a los dibujos que, por representar una realización preferente de dicho objeto, con carácter informativo, deben considerarse en su sentido más amplio y no como limitadores de la aplicación y el contenido de la invención.

El fluido en el seno del cual se produce la electroforesis, es un gas inerte.

Sus componentes estructurales, son:

Una cámara oscura (1), con flujo controlado del gas inerte, provista de dos electrodos (2)-(2') de plancha metálica en extremos opuestos, alimentación de gas (3) a presión, e inyección de la muestra acuosa de proteínas o ácidos nucleicos.

Un electro-spray (4) con equipo de bombeo (5), inyector de la muestra nebulizada en partículas de pocos nanómetros.

Un sistema electrónico de adquisición de datos, acoplado a un ordenador (6), previa calibración del aparato, capaz de calcular el tiempo invertido por las moléculas de la muestra en recorrer la distancia que separa los electrodos (2)(2').

Una fuente de alimentación de energía eléctrica en corriente continua (7), con posibilidad de conexión alternativa y simultánea a los electrodos (2)-(2'), mediante medios de conmutación (8) adecuados para informar al ordenador de su conexión.

Las partículas con carga eléctrica producidas por el electro-spray son inyectadas a presión en la cámara (1) y barridas hacia el electrodo (2) más próximo por el flujo de gas inerte (3) pasado por el filtro (9), quedando retenidas en dicho electrodo por la acción del campo eléctrico del mismo, hasta la conexión de ambos electrodos a polos opuestos de una fuente de alimentación de energía eléctrica en corriente continua (7) cuando se ha inyectado la totalidad de la muestra, en cuyo momento se inicia la migración electroforética de las macromoléculas, registrándose por el ordenador (6) tanto el momento de la partida de ellas del electrodo (2) como el de su llegada al electrodo opuesto (2'), a efectos del cálculo programado del tiempo invertido en su recorrido de un electrodo al otro.

En la disposición que requiere radiactividad para la detección de la llegada de las moléculas al segundo electrodo (2'), éstas son marcadas previamente por un radioisótopo; y porque dicho electrodo (2') está formado por dos planchas metálicas (10)-(10') (Figura 1), de las cuales la frontal (10) presenta numerosos orificios (11) distribuidos ordenadamente, entre cuyas planchas se coloca una placa transparente de centelleo (12), con orificios coincidentes con los de la plan-

cha frontal (10), de modo que al atravesar las moléculas el centelleador (12), las partículas emitidas por su radiactividad producen luz de centelleo que es captada por un fotodetector (13) que la transforma en un pulso eléctrico que informa al ordenador (6) de la finalización del recorrido de las macromoléculas.

En la disposición que no requiere radiactividad, la llegada de las macromoléculas es señalada por un detector eléctrico gaseoso (14) que actúa como segundo electrodo y utiliza el propio gas inerte electroforético como medio de detección

ya que, al aproximarse las moléculas al detector, encuentran un elevado campo eléctrico que hace que se aceleren y choquen con el gas, produciendo una avalancha de electrones detectable como señal eléctrica.

Un tercer método de detección, que no hace uso de la radiactividad, está basado en que, al llegar las macromoléculas a las proximidades del segundo electrodo, producen una radiación lumínica, mediante diversos procesos físicos, detectable con la suficiente rapidez y precisión temporal.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Secuenciador perfeccionado de proteínas y ácidos nucleicos por electroforesis, y procedimiento para su operación, **caracterizado** esencialmente porque el fluido en el seno del cual se produce la electroforesis, es un gas inerte; y porque sus componentes estructurales, son:

Una cámara oscura (1), con flujo controlado del gas inerte, provista de dos electrodos (2)-(2') de plancha metálica en extremos opuestos, alimentación de gas (3) a presión, e inyección de la muestra acuosa de proteínas o ácidos nucleicos.

Un electro-spray (4) con equipo de bombeo (5), inyector de la muestra nebulizada en partículas de pocos nanómetros.

Un sistema electrónico de adquisición de datos, acoplado a un ordenador (6), previa calibración del aparato, capaz de calcular el tiempo invertido por las moléculas de la muestra en recorrer la distancia que separa los electrodos (2)-(2').

Una fuente de alimentación de energía eléctrica en corriente continua (7), con posibilidad de conexión alternativa y simultánea a los electrodos (2)-(2'), mediante medios de conmutación (8) adecuados para informar al ordenador de su conexión.

2. Secuenciador perfeccionado de proteínas y ácidos nucleicos por electroforesis, y procedimiento para su operación, según la Reivindicación 1ª, **caracterizado** esencialmente porque el procedimiento para su operación es el siguiente: las partículas con carga eléctrica producidas por el electro-spray son inyectadas a presión en la cámara (1) y barridas hacia el electrodo (2) más próximo por el flujo de gas inerte (3) pasado por el filtro (9), quedando retenidas en dicho electrodo por la acción del campo eléctrico del mismo, hasta la conexión de ambos electrodos a polos opuestos de una fuente de alimentación de energía eléctrica en corriente continua (7) cuando se ha inyectado la totalidad de la muestra, en cuyo momento se inicia la migración electroforética de las macromoléculas, registrándose por el ordenador (6) tanto el momento de la partida de ellas del electrodo (2) como el de su llegada al electrodo

opuesto (2'), a efectos del cálculo programado del tiempo invertido en su recorrido de un electrodo al otro.

3. Secuenciador perfeccionado de proteínas y ácidos nucleicos por electroforesis, y procedimiento para su operación, según las Reivindicaciones precedentes, **caracterizado** esencialmente porque para la detección de la llegada de las moléculas al segundo electrodo (2'), éstas son marcadas previamente por un radioisótopo; y porque dicho electrodo (2') está formado por dos planchas metálicas (10)-(10') (Figura 1), de las cuales la frontal (10) presenta numerosos orificios (11) distribuidos ordenadamente, entre cuyas planchas se coloca una placa transparente de centelleo (12), con orificios coincidentes con los de la plancha frontal (10), de modo que al atravesar las moléculas el centelleador (12) las partículas emitidas por su radiactividad producen luz de centelleo que es captada por un fotodetector (13) que la transforma en un pulso eléctrico que informa al ordenador (6) de la finalización del recorrido de las macromoléculas.

4. Secuenciador perfeccionado de proteínas y ácidos nucleicos por electroforesis, y procedimiento para su operación, según las Reivindicaciones 1ª y 2ª, **caracterizado** esencialmente porque la llegada de las macromoléculas es señalada por un detector eléctrico gaseoso (14) que actúa como segundo electrodo y utiliza el propio gas inerte electroforético como medio de detección ya que, al aproximarse las moléculas al detector, encuentran un elevado campo eléctrico que hace que se aceleren y choquen con el gas, produciendo una avalancha de electrones detectable como señal eléctrica.

5. Secuenciador perfeccionado de proteínas y ácidos nucleicos por electroforesis, y procedimiento para su operación, según las Reivindicaciones 1ª y 2ª, **caracterizado** esencialmente porque al llegar las macromoléculas a las proximidades del segundo electrodo, producen una radiación lumínica, mediante diversos procesos físicos, detectable con la suficiente rapidez y precisión temporal.

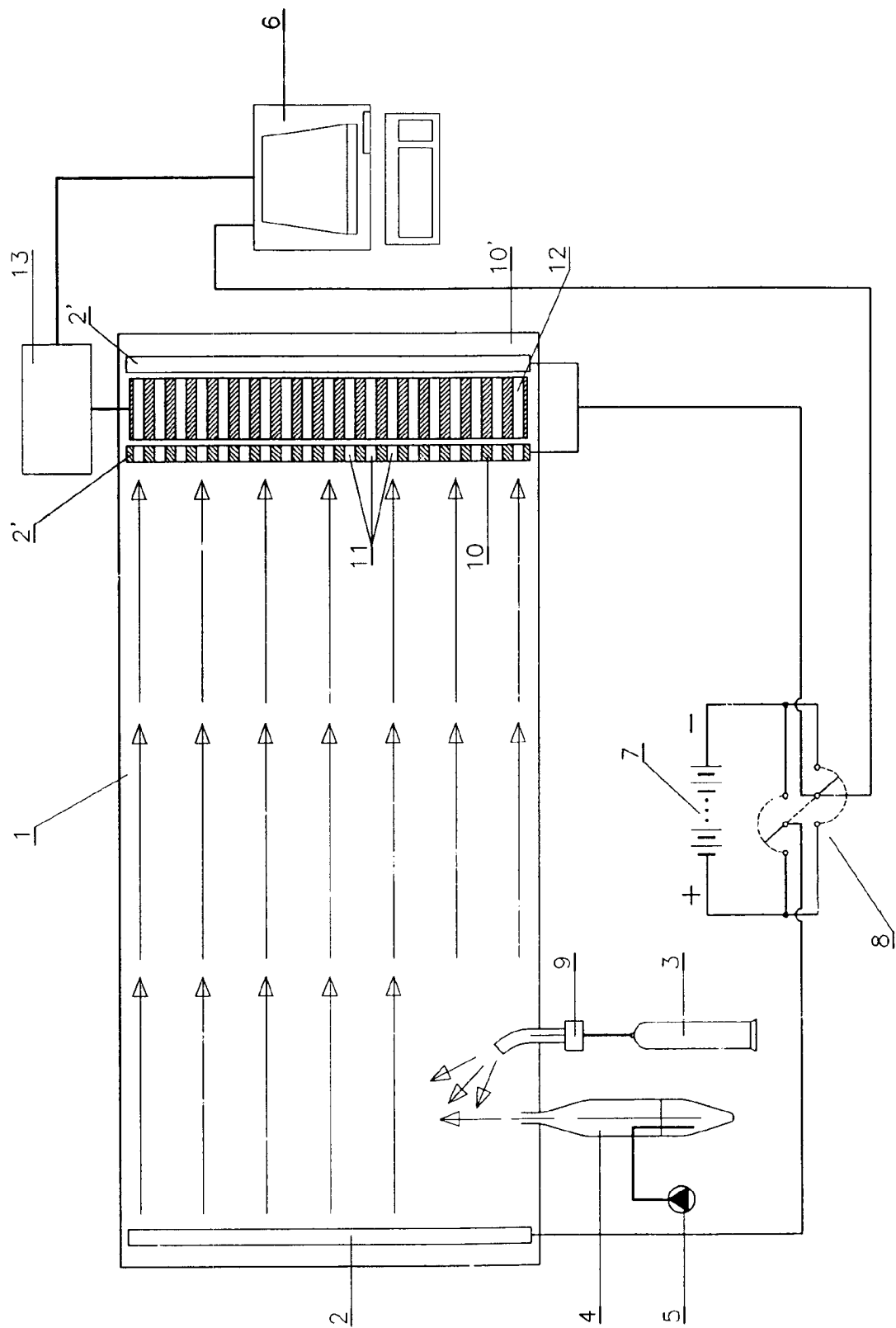


FIG. 1

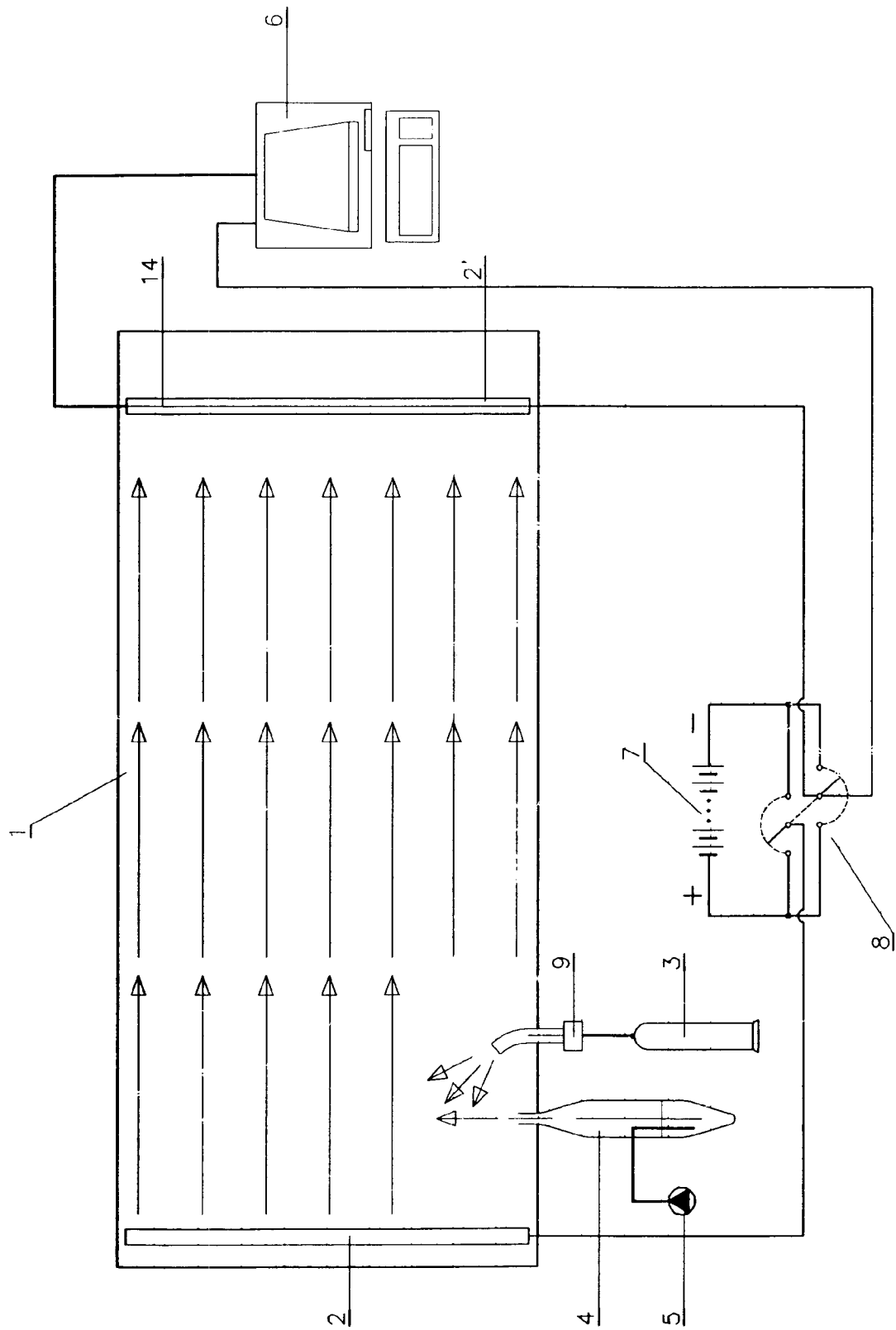


FIG.2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 153 768
⑫ N.º solicitud: 009900529
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 15.03.1999
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: G01N 27/447

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| A | US 4146454 A (HABER) 27.03.1979, todo el documento. | 1-5 |
| A | US 5240578 A (TATSUMI) 31.08.1993, todo el documento. | 1-5 |
| A | REIMANN, F. et al. "Gas-phase sequencing of peptides and proteins". En: Advanced methods in protein microsequence analysis. Editado por B. Wittmann-Liebeld et al. Berlin: Springer, 1986, páginas 118-125. Todo el documento. | 1-5 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

| | | |
|--|---------------------------------|---------------|
| Fecha de realización del informe 19.01.2001 | Examinador J.L. Vizán Arroyo | Página 1/1 |
|--|---------------------------------|---------------|